

Cytomegalovirus infection and transplant arteriosclerosis : an experimental study in rats

Citation for published version (APA):

Li, F. (1999). *Cytomegalovirus infection and transplant arteriosclerosis : an experimental study in rats*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19991215fl>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19991215fl](https://doi.org/10.26481/dis.19991215fl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY AND GENERAL DISCUSSION

Growing knowledge of transplant immunology and introduction of new immunosuppressive agents have dramatically improved the early results of organ transplantation. However, chronic rejection, or TAA, is still a major obstacle to long-term survival of transplanted organs. Although the exact mechanisms responsible for the initiation and progression of TAA are not completely understood, it has been postulated that TAA may be induced or accelerated by CMV infection. In this thesis, a series of experiments were designed to further characterize the role of CMV infection in the development of chronic rejection, using rat aortic and renal transplantation models.

In the first study of the thesis (**chapter 3**), a correlation between the intensity of CMV infection and the amount of perivascularitis, one of the pathological characteristics of TAA, was investigated in rat aortic allografts. For this purpose, recipients were inoculated with either active RCMV (living virus) or inactivated RCMV (dead virus) and were immunosuppressed by sublethal challenge of total body irradiation to enhance the generalized CMV infection in hosts, mimicking the clinical situation of immune-compromised transplant recipients with CMV infection. The subsequent general (transplant recipient) and local (transplanted organ or tissue) CMV infection in rats was evaluated by plaque titration assay for infectious virus and immunohistochemical staining for viral antigens. As expected, the amount of virus replication in the host was related to the dosages of total body irradiation, i.e. the viral replication was enhanced in animals receiving 5 Gy of total body irradiation than those given none or 3 Gy of total body irradiation. Although the number of inflammatory cells accumulating in the graft perivascular area was decreased after total body irradiation, CMV infection caused enhanced perivascularitis in rats that received 5 Gy of total body irradiation compared to the non-infected animals. Immunohistochemical study demonstrated that the CMV-induced effect was characterized predominantly by an increased T lymphocyte infiltration, including both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In summary, (1) higher degree total body irradiation (5 Gy) enhanced the replication of RCMV, leading to CMV infection in almost all the organs of the animals; (2) the magnitude of inflammatory response (perivascularitis) in aortic allografts correlated with the amount of infectious virus in the hosts; (3) the increased perivascularitis related more to the enhanced systemic CMV infection in the host by strong immunosuppression than to the early immunosuppression per se.

Since no infectious virus nor viral antigens were detectable in the vessel wall we propose that or the level of virus and viral antigens is too low for the detection techniques used in this study or the virus remains in a latent, yet undetectable state in the vessel wall. Another mechanism involved in the persistent inflammation observed in this study is that the effect is probably the result of presence of virus in the host leading to stimulation of the alloreaction. Since we know from human studies that CMV is able to persist in the vessel wall, especially in the smooth muscle cell layer, we speculate that the same occurs in the rat model and that the virus is present at very low levels in a non infectious state in the aorta and that its presence is responsible for the effects observed in this study.

Endothelial cells of allografts, which can be injured during preservation and/or early reperfusion, are the primary targets of host immune responses. The injured endothelial cells might release various growth factors, which in turn cause migration of smooth muscle cells into the intima and replication of smooth muscle cells in the neointima, thus leading to intimal thickening, a major feature of TAA. Moreover, it has been postulated that the immune inflammatory cells and factors they produce may also play an important role in the development of intimal proliferation. Therefore, in the second study of the thesis (**chapter 4**), the role of early endothelial cells injury in the progression of TAA was investigated with allogeneic (BN to Lewis combination, across both MHC class I and II barriers) and syngeneic (Lewis to Lewis) aortic transplantation model. In the longitudinal sections of aortic allografts, an endothelial denudation was observed as early as day 2 in both allografts and isografts. The anastomosis areas of aortic grafts exhibited more profound endothelial lesion than the mid-segments of grafts. There was more severe endothelial cells denudation in allografts compared to syngeneic grafts. Regeneration of endothelial cells in allografts was observed at day 7, but was not completed until day 28. In syngeneic grafts, however, the regeneration was quicker. Likewise, neointima formation occurred earlier at the anastomosis area than the middle sections of grafts and was only observed in the allografts. These tendency existed until day 28. Unlike isografts, an infiltration of inflammatory cells (mainly monocytes and lymphocytes) in the adventitia of allografts (perivasculitis) was observed at day 7. The inflammation reached the peak at day 28, declined slowly thereafter, but persisted at relative lower levels until day 60. These results provided strong evidence that the initial endothelial injury is related to the accelerated development of the alloantigen-dependent arteriosclerotic lesions.

Effects of CMV infection on the components of perivascular infiltration of inflammatory cells and extents of neointima formation in aortic allografts were described in **Chapter 5** of the thesis. As the above experiments, the immunosuppressed (5 Gy total body irradiation) aortic recipients were inoculated with RCMV or left uninfected. Compared with the minimum pathological changes in syngeneic grafts, an increased perivascular influx of inflammatory cells in allografts, which peaked at day 28, was observed. Although there was only a slightly enhanced inflammation in the CMV-infected allografts than the non-infected group, a significant difference in number of infiltrating T cells was observed in the infected allografts at day 28. Immunohistochemical study demonstrated that CMV infection caused increased influx of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and led to activation of these cells, as indicated by higher expression of interleukin-2 receptors. This enhanced T cell influx was related to the presence of active replicating virus in the host. Further, a clear tendency for increased intimal thickening was found in the infected allografts. At later stage (day 90), CMV infection also resulted in augmented expression of MHC class II positive cells in allografts. Perivascular infiltration of monocytes and macrophages and expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 were not influenced by the infection. It is, therefore, concluded that active CMV infection may cause increased perivascular influx of leucocytes resulting intimal thickening in the aortic allografts.

Since the above CMV-enhanced perivasculitis appeared to be a mainly T cell mediated process, in which MHC antigens played an important role, the effects of CMV infection on chronic

rejection seems to be related to its action on immune modulation. The next question raised in **chapter 6** of the thesis was what role of MHC antigens (class I or II antigens) play in the CMV-enhanced TAA, or in another words, which kind of MHC mismatched allografts was influenced more by CMV infection? Towards this end, we transplanted aortas across either MHC class I or class II different barriers in absence or presence of CMV infection. It was found that the exchange of allografts between rat strains that displayed histocompatibility differences in either class I or II led to neointima formation. However, CMV infection significantly accelerated this process more in the MHC class I different combination than class II disparity. Interestingly, this increased neointima formation in MHC class I mismatched combination was associated with the early (day 7) increased infiltration of monocytes/macrophages in the perivascular area of allografts. It seems that no direct correlation exists between the intensity of perivascular infiltration and the neointima formation, since in MHC class II-mismatched combination CMV infection upregulated T cell influx at day 28, but intimal thickening was not significantly stimulated. The findings of this study suggest that CMV infection stimulates the effect of MHC class I mismatching.

Although the same observations are not described for other virus, there is a lot of evidence that similar effects are generated by other viral infections. For example infections with lymphocytic choriomeningitis virus lead to the generation of alloreactive T lymphocytes. These alloreactive cells lyse allogeneic but not syngeneic cells. There are also indications that they are directed especially against allogeneic MHC class I antigens. Also in mice infected with CMV high levels of alloreactive T cells were found. MHC class I antigen serves as a target for these cells. In a setting with class II disparity no virus-induced effect was observed. In the mice it was shown that CMV infection enhances the severity of graft-versus-host-disease across a class I disparity. Taken together all these results indicate that virus and especially CMV infection stimulates the alloreaction especially when MHC class I disparity between donor and recipient are present. Whether presence of homologs of the virus and MHC class I are importance for this allostimulation is not known. This should be further analysed probably using deletion mutants of the virus.

Prior to transplantation, organs from cadaveric donors are unavoidably subjected to cold ischemia during organ procurement, transportation and preservation awaiting for tissue typing. Ischemia and the subsequent reperfusion may cause grafts injury, which has also been implicated as a risk factor for chronic rejection. This leads to a question whether CMV infection and prolonged ischemia (24 h) act synergistically on the progression of chronic rejection. To elucidate this question, a rat renal transplantation model was used in the **chapter 7**. Lewis recipients of BN renal allografts treated shortly with cyclosporin A (15 mg/kg) were killed on days 10 or 60. The data showed that CMV infection alone increased inflammatory responses, neointima formation and glomerular sclerosis in renal allografts. Proceeding prolonged cold ischemia resulted in even profound injury and inflammation in the renal grafts of CMV infected recipients. Immunohistochemical staining of grafts removed on day 10 showed an increased perivascular infiltration of monocytes/macrophages and interstitial influx of CD8⁺ T cells in the CMV infected allografts. Long cold ischemia alone, however, led to enhanced perivascular and interstitial influx of natural killer cells. In grafts with both long cold ischemia and CMV infection, a higher intensity of infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T cells, natural killer cells and monocytes/macrophages

was observed. At day 60, CMV infection resulted in enhanced expression of MHC class II-antigens on endothelium in the allograft. The result suggest a synergistic effect of prolonged cold ischemia and CMV infection in the development of chronic rejection.

TAA can be considered as the result of direct immunological injury to the vessel wall. It has been proposed that attachment of lymphocytes to the allogeneic endothelium and subsequent endothelial damage create an "activation" state than trigger intimal proliferation. Infections with CMV accelerates this process.

CMV is known for its potential to stimulate endothelial cells. Its effects include the induction of proliferation and also the upregulation of adhesion molecules, MHC class I and MHC class II. The expression of these molecules is important for allograft rejection. CMV is also able to stimulate the production of important compounds such as chemoattractants for leucocytes, IL-1, IL-6, IFN- γ and TNF. CMV not only activates endothelial cells but also activates monocytes/macrophages. These cells are important producers of growth factors. Most likely the effects of CMV infection on TAA are due by a combination of an increased infiltration of leucocytes and activation of endothelial cells and monocytes/macrophages.

Although the etiology of TAA is presumed to be alloantigen-dependent and immunologically derived also is clear that nonimmunologic factors such as ischemic have important roles in the induction and progression of the disease. The central hypothesis is that some form of damage of the endothelium of the graft results in dysfunction of the endothelium. The damage can as shown in our study be induced by the alloreaction, by CMV infection and by ischemia. The role of CMV in this process is dependent of active virus in the host (i.e. the rat) but is not dependent of active virus infection of the endothelial cells i.e. replication of CMV in endothelial cells. Although the activation of TAA by CMV is not completely understood two possible mechanisms could be involved:

- the first mechanism is that entry of the virus in cells leads into a activation of these cells resulting in (enhanced) expression of adhesion molecules, cytokines and chemokines leading to (enhanced) interaction with T lymphocytes and monocytes/macrophages resulting in production of active compounds such as TNF and IL-1 and growth factors.
- The second mechanism is that CMV infection of the host leads to a stimulation of the immunereaction in general and of the alloreaction in particular.
- The finding that CMV infection failed to induce TAA in syngeneic grafts provides evidence for the hypothesis that TAA is an immunologic event and that the alloreaction is necessary for its occurrence.

From data of atherosclerosis and restenosis experiments obtained in our and other laboratories together with the data in this thesis, it can be concluded that CMV infection of the host is involved directly or indirectly in upregulation of chronic inflammatory responses in the allograft and in proliferation of smooth muscle cells leading into (enhanced) neointima formation (Fig. 1). These effects are induced by very low, even undetectable levels of active virus in the host. Induction of "active" compounds such as cytokines an growth factors are involved in the indirect effects while interaction of viral gene products with cellular gene products (such as p53) are probably involved in the direct effects.

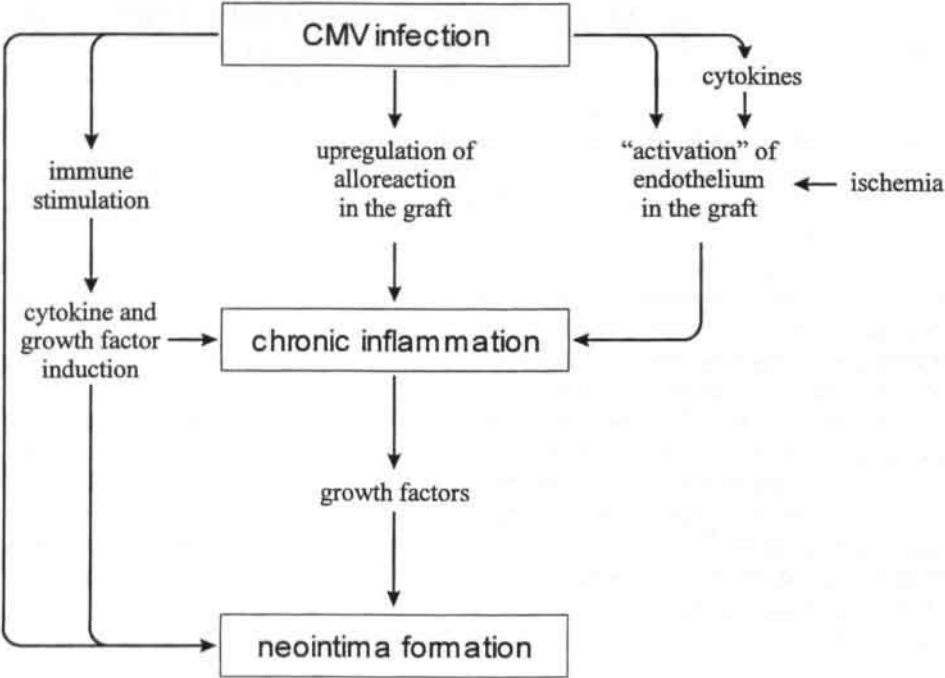


Fig. 1. Direct and indirect effects of CMV infection on chronic inflammation and neointima formation.

SAMENVATTING

Alhoewel de resultaten van orgaantransplantaties -in het bijzonder van niertransplantaties- over het algemeen bijzonder goed zijn waardoor de overlevingskansen van patiënten die een getransplanteerd orgaan ontvangen hebben sterk toegenomen zijn, komen er op langere termijn veelvuldig complicaties voor. Deze langer(e) termijn-effecten worden ook wel chronische afstoting genoemd. Deze worden gekenmerkt door een chronische ontsteking in het getransplanteerde orgaan welke op termijn het "normale" functioneren van het orgaan verstoort. Een van de belangrijkste kenmerken van dit proces is de voortdurende (persisterende) ontstekingsreactie, rondom de vaten van het getransplanteerde orgaan en een verdikking van de vaatwand (neointimavorming) waardoor de opening (lumen) van het vat verkleint en op termijn zelfs helemaal afgesloten wordt. Dit proces wordt ook wel transplantatie-geassocieerde arteriosclerose genoemd. Niet alle oorzaken van het optreden van dit arteriosclerose-proces zijn bekend. Van een aantal factoren weten we inmiddels wel dat ze een rol spelen in het optreden van deze transplantatie-geassocieerde arteriosclerose. Eén ervan is de afstotingsreactie die optreedt tengevolge van de verschillen in weefselantigenen, ook wel transplantatie-antigenen genoemd, op cellen van de donor van het orgaan en van de ontvanger van het orgaan.

Daarnaast zijn nog andere factoren bekend die een rol spelen, tot deze behoren wellicht ook de infecties met het cytomegalovirus (CMV).

De bijdrage van infecties met CMV aan de chronische afstoting na orgaantransplantatie werden voor het eerst aangetoond op het eind van de jaren tachtig in de Verenigde Staten van Amerika door Grattan en medewerkers. Sindsdien is dit, zij het met wisselend succes, aangetoond door diverse andere onderzoekers. Om de mogelijke bijdrage van CMV-infecties aan het arteriosclerose proces nader uit te zoeken, maar nu in "goed gedefinieerde" omstandigheden, werd het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt, ondernomen.

In dit proefschrift werd het onderzoek naar de bijdrage van CMV infecties aan het ontstaan van transplantatie-geassocieerde arteriosclerose onderzocht door gebruik te maken van diersmodellen. Het rattenmodel is voor transplantatie onderzoek een frequent gebruikt diersmodel dat door de beschikbaarheid van inteelt rattenstammen ook geschikt is om de afstotingsreactie nader te bestuderen. Door de beschikbaarheid van ratten-CMV (RCMV), dat sterke verwantschap vertoont met het humane CMV, is ook virologisch onderzoek in een dergelijk diersmodel mogelijk. Voor het transplantatie-onderzoek werden er twee modellen gebruikt: het eerste is het aortatransplantatiemodel. Dit model is een relatief ongecompliceerd transplantatiemodel dat eenvoudig uitvoerbaar is en het grote voordeel heeft dat er geen immuunsuppressie noodzakelijk is om het transplantaat in de ontvangerrat te laten overleven. Het tweede model is het niertransplantatiemodel dat eveneens uitvoerbaar is in ratten en dat sterke gelijkenis vertoont met de situatie in de mens. Het model is complexer van aard maar biedt het voordeel dat het sterke gelijkenis vertoont met de in vivo situatie bij de mens.

In het eerste deel van het onderzoek (hoofdstuk 3) is de bijdrage van een CMV-infectie aan het ontstaan en de ontwikkeling van transplantatie-geassocieerde arteriosclerose onderzocht. Er is voornamelijk aandacht besteed aan het optreden van de ontsteking die in de perivasculaire zone van het getransplanteerde vat ontstaat. Om dit te onderzoeken is gebruik gemaakt van twee

veelvuldig in Maastricht gebruikte en in de Centrale Dienst voor Proefdier- voorzieningen gefokte rattenstammen: de Bruine Noorse rat (BN) en de Lewis rat. De dieren werden geïnjecteerd met RCMV dat afkomstig was van speekselklieren van acuut geïnfecteerde dieren. Als controle werd geïnactiveerd virus gebruikt.

CMV infecties worden gekenmerkt door een relatief onschuldig (subklinisch) infectieverloop bij de normaal gezonde gastheer d.w.z. bij de gastheer die een "normaal" functionerend immuunsysteem heeft. Wanneer echter de gastheer een verminderde weerstand heeft zoals dit het geval is, door toediening van immuunsuppressieve middelen hetgeen in de regel het geval is bij orgaantransplantaties, dan verloopt de CMV infectie veel ernstiger en treedt er uitgebreide CMV replicatie op in vele organen. De mate van de immuunsuppressie bepaalt grotendeels de ernst van de infectie. Om dit te bestuderen zijn daarom ook in dit onderzoek diverse doseringen van immuunsuppressie meegenomen.

De vorm van immuunsuppressie waarvoor in deze studie gekozen is, is de totale lichaamsbestraling. De doseringen die gebruikt werden waren: 3 Gray en 5 Gray. Daarnaast werden er niet-bestraalde dieren meegenomen. De dieren werden telkens met RCMV geïnfecteerd door middel van een intraperitoneale injectie met 10^5 plaque vormende eenheden virus op de dag van de transplantatie. De ratten werden geofferd op dag 7 en 28 na transplantatie en de getransplanteerde aorta werd onderzocht.

Naast de allogene aortatransplantaties (van BN naar Lewis ratten) werden er ook syngene controles (BN-BN combinaties) meegenomen.

De aorta's werden onderzocht op aanwezigheid van virus en op aanwezigheid van morfologische veranderingen in de vaatwand. In het bijzonder ontstekingsinfiltraten werden aangekleurd. Dit gebeurde door immunoperoxidase kleuringen van paraffine coupes met behulp van specifieke monoclonale antistoffen gericht tegen antigenen op bepaalde cellen (lymfocyten en macrofagen). Zoals verwacht, was de hoeveelheid virus en virus geïnfecteerde cellen afhankelijk van de mate van immuunsuppressie. In dieren die de hoogste dosis immuunsuppressie gekregen hadden (5 Gray) was de infectie ernstiger dan in de dieren die een mildere vorm of geen immuunsuppressie gekregen hadden. Alhoewel de ontsteking in de perivasculaire ruimte in de vroege fase (dag 3) was afgenomen na de bestraling, was het effect van de CMV infectie toch duidelijk zichtbaar en dan in het bijzonder op een later tijdstip (dag 28). Het aantal T-lymfocyten was in geïnfecteerde dieren die 5 Gray lichaamsbestraling gekregen hadden, significant hoger dan in de niet-bestraalde dieren. In de dieren die een mildere vorm van immuunsuppressie gekregen hadden -ofwel geen immuunsuppressie- werd er geen significant verschil gevonden.

Verder onderzoek naar het soort T-lymfocyt dat aanwezig was in de perivasculaire ruimte toonde aan dat de stijging zowel de CD_4^+ T-cellen als de CD_8 T-cellen betrof. Wat de influx van de monocyten/macrofagen betreft: ook bij deze cellen werd op dag 7 na bestraling een daling in de influx van cellen in de adventitia vastgesteld, die op dag 28 tenietgedaan werd. Bij deze cellen echter werd er geen significant verschil gevonden in de mate van influx van cellen in de adventitia tussen de geïnfecteerde en de niet-geïnfecteerde dieren.

Deze experimenten laten dus zien dat na een allogene aortatransplantatie er een ontstekingsreactie plaats vindt. Deze bestaat voornamelijk uit T-lymfocyten en uit macrofagen. Infecties met CMV leiden tot een toename in de influx doch voornamelijk van T-lymfocyten. Het effect van de infectie op de influx van monocyten/macrofagen is eerder beperkt. Wanneer de ontvangers immuunsuppressie ondergaan hadden was het virus-effect toegenomen. Een verklaring hiervoor

ligt waarschijnlijk in de toename in virusreproductie tengevolge van de immuunsuppressie waardoor de virus geïnduceerde pathologie, in dit geval de perivasculaire ontsteking, toeneemt. Het effect van het virus op de ontsteking in de adventitia werd niet gevonden bij de syngene getransplanteerde aorta's en ook niet wanneer geïnactiveerd virus werd toegediend. Dit wijst erop dat actieve reproductie van het virus in de gastheer noodzakelijk is maar ook dat er een verschil tussen donor en ontvanger aanwezig moet zijn (allogene barrière) om een viruseffect te kunnen waarnemen. De hypothese is dan ook, dat het hier geen rechtstreeks virus effect betreft, maar eerder een onrechtstreeks effect van het virus op de afweerreactie op het transplantaat en dat dit leidt tot versterkte ontsteking. Het virus versterkt de allereactie en is derhalve immuunmodulerend, in dit geval immuunstimulerend actief.

De binnenkant van de vaten is bekleed met endotheelcellen. Deze cellen zijn van groot belang in een aantal vitale processen zoals stolling en bloeddruk en beschermen de onderliggende weefsels en cellen tegen "vreemde indringers" zoals onder andere virussen. Beschadiging van het endotheel leidt tot "activatie" van deze cellen waardoor er adhesiemoleculen op deze cellen tot expressie komen, leidend tot verhoogde adherentie van leucocyten aan het endotheel. Ook vindt er een verhoogde productie van "immuunactieve" stoffen plaats zoals onder andere interleukines en chemotactische stoffen zoals bijvoorbeeld interleukine-8 dat een chemo-attractant is voor de polymorfonucleaire cellen. Ook groeifactoren kunnen ten gevolge van schade van het endotheel geïnduceerd worden. Activatie van het endotheel kan daarnaast ook gebeuren ten gevolge van infecties zoals met CMV, maar ook bij vele andere processen, zoals bijvoorbeeld ischemie.

Om het effect van schade aan het endotheel op transplantatie-geassocieerde arteriosclerose te bestuderen is onderzoek verricht in het aortatransplantatiemodel (hoofdstuk 4). In dit model werd het effect van de schade van het endotheel die in de eerste dagen na de transplantatie optreedt onderzocht op ten eerste het ontstaan van de perivasculaire ontsteking en de tweede op neointimavorming. Om dit te analyseren werden er van de getransplanteerde vaten dwars- en lengte-doorsneden gemaakt en werd op diverse tijdstippen na transplantatie de neointimavorming gemeten. De influx van ontstekingscellen werd geanalyseerd door gebruik te maken van de immunoperoxidase kleuring met monoclonale antistoffen gericht tegen (oppervlakte) antigenen op de diverse ontstekingscellen.

In dit onderzoek werd wederom de combinatie BN-Lewis ratten gebruikt als allogene transplantatiemodel. Als controles werden er syngene (Lew-Lew) transplantaties gebruikt. Sterke endotheelschade was voornamelijk aanwezig op de anastomose-plaatsen, terwijl dit veel minder het geval was in het midden van het getransplanteerde vat. Regeneratie van het endotheel werd waargenomen vanaf dag 7 maar was nog niet volledig hersteld op dag 28. De vorming van een neointima in de allogene getransplanteerde vaten was het eerst op de plaats van de anastomose terwijl dit veel langzamer optrad in het midden van het vat. Op dag 60 na transplantatie was de neointima nagenoeg overal even sterk aanwezig d.w.z. over de hele lengte van het vat. In de syngene vaten vond er veel minder neointimavorming plaats en was deze voornamelijk aanwezig op de anastomose-plaatsen. Ook wat betreft de ontstekingsreactie in de adventitia was er duidelijk een verschil waar te nemen tussen de allogene vaten en de syngene vaten. In deze laatste was de ontsteking minder sterk aanwezig dan in de allogene vaten. Ook was de perivasculaire ontsteking veel langer aanwezig in de allogene vaten dan in de syngene vaten. Dit

toont aan dat verschillen tussen donor en ontvanger van groot belang zijn voor het optreden van een persisterende ontsteking in de getransplanteerde aorta. Ook voor de vorming van een neointima is het verschil tussen donor en ontvanger voor wat betreft weefselantigenen, van groot belang. Daarnaast levert beschadiging van het endotheel eveneens een bijdrage aan het optreden van de ontstekingsreactie in de adventitia. Dit effect is echter voornamelijk aanwezig in de acute fase (eerste dagen na transplantatie), maar is op zichzelf niet voldoende om te leiden tot langdurige ontsteking. CMV heeft een effect op de ontstekingsreactie rondom deze allogene vaten. Het effect van de infectie op de ontsteking is voornamelijk toe te schrijven aan een toename in het aantal (geactiveerde) T-lymfocyten hetgeen er dus weer op wijst dat het virus op een wellicht indirecte manier het immuunsysteem stimuleert.

Verder onderzoek naar de perivasculaire ontsteking in de vaten werd beschreven in hoofdstuk 5. Door gebruik te maken van het allogene aortatransplantatie model kon worden aangetoond dat infectie met levend CMV leidde tot optreden van een ontstekingsreactie in de adventitia. Deze ontstekingsreactie was aanwezig op dag 7 maar was op dag 28 na transplantatie nog in sterkte toegenomen. Het effect was vooral aanwezig voor het aantal CD_4^+ en CD_8^+ T-lymfocyten in de perivasculaire ruimte. Ook werden er in de CMV-geïnfecteerde groep significant meer cellen gevonden die interleukine-2 receptor positief waren dan in de controle groep. Dit betekent dus dat er een activatie had plaats gevonden van de aanwezige T-lymfocyten. Onderzoek naar de aanwezigheid van MHC-II antigenen op het oppervlak van cellen toonde aan dat dit significant meer was in de getransplanteerde aorta's van geïnfecteerde dieren dan van de controle dieren. Ook werd er meer expressie van de adhesiemolecule ICAM-1 gevonden op de cellen van de CMV geïnfecteerde aorta's dan van de controle aorta's hetgeen ook weer aantoont dat CMV infectie leidt tot activatie van cellen, in dit geval endotheelcellen in het getransplanteerde orgaan. Voor al deze virus-geïnduceerde effecten is actieve infectie noodzakelijk. Injectie van geïnactiveerd virus immers leidde niet tot de opregulatie van de influx van ontstekingscellen en ook niet tot activatie van de aanwezige lymfocyten of endotheelcellen.

Uit de resultaten beschreven in voorgaande hoofdstukken is duidelijk naar voren gekomen dat verschillen in weefselantigenen tussen donor en ontvanger van belang zijn voor het optreden van een transplantatie-geassocieerd arterioscleroseproces. Om dit verder uit te zoeken is onderzoek verricht in rattenstam-combinaties waarbij er ofwel een verschil in de MHC-klasse I antigenen aanwezig was, ofwel een verschil in de MHC-klasse II antigenen (hoofdstuk 6). Voor het MHC-klasse I verschil werd de ratten-combinatie: donor: Lewis en Rp rat als ontvanger gebruikt; voor het MHC-klasse II verschil werd de Wag/Rij rat als donor gebruikt en de Rp rat als ontvanger. De aortatransplantatie experimenten werden verder op dezelfde wijze uitgevoerd als bij de eerdere beschreven BN-Lewis experimenten. De ratten werden bestraald met 5 Gray totale lichaamsbestraling en infectieus RCMV werd via intraperitoneale route geïnjecteerd. Op diverse tijdstippen na transplantatie werden de getransplanteerde vaten onderzocht op aanwezigheid van een ontstekingsreactie en op de vorming van een neointima. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de influx van monocyten/macrofagen versterkt is doch dat dit voornamelijk gebeurt in de ratten met een verschil in MHC-klasse I antigenen. Dit effect is echter slechts waarneembaar in de vroege fase (dag 7) na de transplantatie. In de rattencombinatie met een verschil in MHC-klasse II leidt CMV infectie tot een toename in de influx van T-lymfocyten in de adventitia. Dit

fenomeen is vooral op dag 28 na transplantatie waarneembaar. Alhoewel de totale ontstekingsreactie sterker aanwezig is in de rattencombinatie met een MHC-klasse II verschil is toch het CMV effect op de neointimavorming in de rattencombinatie met een MHC-klasse I verschil het meest prominent aanwezig. Dit zou er op kunnen wijzen dat voor het optreden van een CMV effect verschillen tussen donor en ontvanger in de MHC-klasse I van groter belang zijn dan verschillen in de MHC-klasse II. Dat CMV ook een invloed heeft op de influx van de monocyt/en/macrofagen in deze rattenstam-combinatie doet vermoeden dat er een correlatie bestaat tussen de aanwezigheid van monocyt/en/macrofagen in de perivasculaire ruimte en de vorming van een neointima. Of de productie van groeifactoren door deze monocyt/en/macrofagen ook verantwoordelijk zijn voor de proliferatie van de gladde spiercellen is vooralsnog onbekend maar zou een verklaring kunnen zijn voor de correlatie tussen deze beide effecten.

Tot slot is ook onderzoek verricht naar de bijdrage van een CMV infectie op de chronische afstoting in een niertransplantatiemodel. Omdat er aanwijzingen waren dat ischemie een rol kan spelen in de pathogenese is dit onderzoek toegespitst op enerzijds de bijdrage van CMV aan de pathogenese van de chronische afstoting en anderzijds de rol van ischemie op dit proces. Om dit uit te zoeken werden niertransplantaties verricht in 4 groepen ratten. De eerste groep bestond uit dieren die geen CMV infectie ondergingen en waarvan de nieren geen verlengde koude ischemie ondergaan hadden. De tweede groep werd met CMV geïnfecteerd. De derde groep werd niet geïnfecteerd maar hiervan werden de nieren aan een verlengde koude ischemie onderworpen. De vierde groep onderging beiden (CMV infectie en verlengde koude ischemie). De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in hoofdstuk 7. Hieruit blijkt dat CMV infectie leidde tot een toename van de ontstekingsreactie, van de neointimavorming en van de glomerulaire sclerose. Verlengde koude ischemie leidde tot een toename van de schade en van de ontstekingsreactie in de getransplanteerde nieren van de geïnfecteerde dieren. Immunohistochemische kleuringen van de nieren die verwijderd waren op dag 10 na transplantatie toonden aan dat er toegenomen perivasculaire infiltraten, hoofdzakelijk bestaande uit monocyt/en en macrofagen, evenals een toegenomen interstitiële influx van CD_4^+ T-lymfocyten aanwezig waren in de CMV geïnfecteerde dieren. Verlengde koude ischemie alleen leidde tot een versterkte perivasculaire en interstitiële ontstekingsreactie terwijl in de nieren van dieren die zowel een CMV infectie ondergaan hadden als onderworpen waren aan een verlengde koude ischemie de intensiteit van de ontstekingsreactie veel sterker was. In deze groep was de influx van CD_4^+ en CD_8^+ T-cellen, NK-cellen en monocyt/en/macrofagen sterk toegenomen, hetgeen wijst op een synergisme tussen schade tengevolge van de CMV-infectie en de schade tengevolge van de verlengde koude ischemie. In deze zelfde ratten was ook activatie van het endotheel waarneembaar op dag 60 na transplantatie.

Samengevat kan men stellen dat in dit proefschrift bevestigd wordt wat door eerdere onderzoeken is vastgesteld, met name dat CMV-infectie leidt tot een versterking van de transplantatie-geassocieerde arteriosclerose.

Het effect van het virus is waarneembaar enerzijds door een toename in de influx van ontstekingscellen in de perivasculaire ruimte en anderzijds door een toename in de neointimavorming. De virusinfectie leidt niet alleen tot een toename in het aantal monocyt/en/macrofagen en T-lymfocyten (CD_4 en CD_8 T-lymfocyten) maar ook tot een activatie van aanwezige cellen (zoals aangetoond door (toegenomen) aanwezigheid van interleukine-2 receptor, MHC-klasse

II antigenen en ICAM-1). Voor het effect van het virus is het noodzakelijk dat er voldaan wordt aan twee voorwaarden: ten eerste levend (actief) virus, ten tweede: allogene orgaantransplantatie. Het feit echter dat geen of nauwelijks virus aangetroffen kon worden in het getransplanteerde orgaan wijst er op dat ofwel minimale (ondetecteerbare) hoeveelheden virus verantwoordelijk zijn voor dit chronische effect ofwel dat een eenmalige actieve infectie, elders in de gastheer, in staat is om een chronisch proces op gang te brengen en dit in afwezigheid van (infectieus) virus in het getransplanteerde orgaan zelf. Diverse andere factoren, waaronder initiële endotheelschade en koude ischemie, spelen eveneens een rol in het proces en versterken dit proces.